

PCT
 ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
 SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)



<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : G01N 33/543, C12Q 1/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 97/04313</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 6 de Febrero de 1997 (06.02.97)</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00151</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 18 de Julio de 1996 (18.07.96)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: P 9501475 18 de Julio de 1995 (18.07.95) ES</p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD DE OVIEDO [ES/ES]; San Francisco, 3, E-33003 Oviedo (ES).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): COSTA GARCIA, Agustin [ES/ES]; Meres, 18, E-33199 Siero (ES). GONZALEZ GARCIA, Maria Begoña [ES/ES]; Arboces, E-33750 La Caridad (ES). FERNANDEZ SANCHEZ, Cesar [ES/ES]; Barcia, E-33787 Lueca (ES).</p> <p>(74) Mandatario: IBÁÑEZ, José F.; Rodríguez San Pedro, 10, E-28015 Madrid (ES).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Estados designados: AU, BR, CA, HU, JP, KR, NO, PL, RO, RU, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00151</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 18 de Julio de 1996 (18.07.96)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: P 9501475 18 de Julio de 1995 (18.07.95) ES</p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD DE OVIEDO [ES/ES]; San Francisco, 3, E-33003 Oviedo (ES).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): COSTA GARCIA, Agustin [ES/ES]; Meres, 18, E-33199 Siero (ES). GONZALEZ GARCIA, Maria Begoña [ES/ES]; Arboces, E-33750 La Caridad (ES). FERNANDEZ SANCHEZ, Cesar [ES/ES]; Barcia, E-33787 Lueca (ES).</p> <p>(74) Mandatario: IBÁÑEZ, José F.; Rodríguez San Pedro, 10, E-28015 Madrid (ES).</p>	<p>(81) Estados designados: AU, BR, CA, HU, JP, KR, NO, PL, RO, RU, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.</i></p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00151</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 18 de Julio de 1996 (18.07.96)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: P 9501475 18 de Julio de 1995 (18.07.95) ES</p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD DE OVIEDO [ES/ES]; San Francisco, 3, E-33003 Oviedo (ES).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): COSTA GARCIA, Agustin [ES/ES]; Meres, 18, E-33199 Siero (ES). GONZALEZ GARCIA, Maria Begoña [ES/ES]; Arboces, E-33750 La Caridad (ES). FERNANDEZ SANCHEZ, Cesar [ES/ES]; Barcia, E-33787 Lueca (ES).</p> <p>(74) Mandatario: IBÁÑEZ, José F.; Rodríguez San Pedro, 10, E-28015 Madrid (ES).</p>	<p>(81) Estados designados: AU, BR, CA, HU, JP, KR, NO, PL, RO, RU, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.</i></p>			
<p>(54) Title: ANALYTICAL ELECTROIMMUNOASSAYS AND ELECTROASSAYS FOR BIOLOGICAL RECOGNITION</p> <p>(54) Título: ELECTROINMUNOENSAYOS ANALITICOS Y ELECTROENSAYOS DE RECONOCIMIENTO BIOLOGICO</p> <p>(57) Abstract:</p> <p>Analytical electroimmunoassays and electroassays for biological recognition, which combine the proper selectivity of immunological reactions with the sensitivity of electrode-absorptive properties of an electrode of carbon paste which is used as support and transducer for the analytical signal. Application to biomedical analysis.</p> <p>(57) Resumen</p> <p>Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico que combinan la selectividad propia de las reacciones inmunológicas con la sensibilidad de las propiedades electródico-adsorptivas de un electrodo de pasta de carbono que se utiliza como soporte y transductor de la señal analítica. Aplicación en análisis biomédicos.</p>				

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	GB	Reino Unido	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	México
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Níger
BB	Barbados	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BE	Bélgica	HU	Hungria	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelandia
BG	Bulgaria	IT	Italia	PL	Polonia
BJ	Benin	JP	Japón	PT	Portugal
BR	Brasil	KE	Kenya	RO	Rumania
BY	Bielarús	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CA	Canadá	KP	República Popular	SD	Sudán
CF	República Centroafricana		Democrática de Corea	SE	Suecia
CG	Congo	KR	República de Corea	SG	Singapur
CH	Suiza	KZ	Kazajistán	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LR	Liberia	SZ	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	LT	Lituania	TD	Chad
CZ	República Checa	LU	Luxemburgo	TG	Togo
DE	Alemania	LV	Letonia	TJ	Tayikistán
DK	Dinamarca	MC	Mónaco	TT	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	MD	República de Moldavia	UA	Ucrania
ES	España	MG	Madagascar	UG	Uganda
FI	Finlandia	ML	Mali	US	Estados Unidos de América
FR	Francia	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistán
GA	Gabón	MR	Mauritania	VN	Viet Nam

Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico

La invención, que tiene aplicación en el campo de los análisis biomédicos, se refiere a electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico que combinan la selectividad propia de las reacciones inmunológicas con la sensibilidad de las propiedades electródico-adsortivas de un electrodo de pasta de carbono que se utiliza como soporte y transductor de la señal analítica. También se refiere a un método para incrementar la sensibilidad de las determinaciones para bajos niveles de concentración del material protéico que recubre al electrodo.

- 5 Los electrodos de pasta de carbono modificados con enzimas han sido recientemente utilizados como transductores de biosensores electroquímicos (Domínguez Sánchez, P., O'Sullivan, CLK., Miranda Ordieres, A.J., Tuñón Blanco, P., Smyth, M.R., 1994, Chim. Actu. 291:349-356).

- Este material electródico de fácil elaboración (polvo de grafito + parafina) desarrollado y experimentado por Adams y colaboradores (Adams, R.N., "Electrochemistry at solid electrodes", 1969, 280-283) al principio de la década de los años 60 y ampliamente utilizado desde entonces, presenta unas características de adsorción sobre distintas sustancias orgánicas que hacen posible llevar a cabo estudios de recubrimiento de distintos materiales de manera fiable sobre su superficie. Estos recubrimientos traen como consecuencia que concentraciones bajas de las citadas sustancias orgánicas puedan ser cuantificadas con facilidad, si en su estructura existieran grupos electroactivos o marcas electroquímicas capaces de ser oxidadas o reducidas al aplicar un potencial determinado al electrodo sobre el que se encuentran
- 15 20 25 (Cortina Villar, J.V., Costa García, A., Tuñón Blanco, P., 1993, Tatania 40:325-331), (Cortina Villar, J.V., Costa García, A., Tuñón Blanco, P., 1992, Anal. Chim. Acta 256,231).

En la bibliografía reciente se encuentra un gran número de métodos ELISA que utilizan la detección electroquímica como fundamento de la cuantificación

analítica (Thompson, R.Q. et al., 1993, Anal. Chim. Acta 271:223-229); (Yu, Z. et al., 1994, Journal of Pharm. and Biomed. Anal. 12:787-793); (Masson, M. et al., 1995, Anal. Chem. 67:1245-1267); (la Gal la Salle et al., 1995, Anal. Chem. 67:1245-1253) realizada con electrodos de carbono vitrificado
5 que muestran las ventajas y los inconvenientes de estas inmuno-electrotecnologías de reciente desarrollo.

Así, se ha demostrado que concentraciones del orden de 10^{-21} M de IgG marcada con fosfatasa alcalina pueden ser detectadas amperométricamente con un electrodo de carbono en un ELISA con detección amperométrica
10 (Thompson, R.Q. et al., 1993, Anal. Chim. Acta 271:223-229) y otros ELISAs con características parecidas han sido puestos a punto con bajos límites de cuantificación para distintos analitos.

La inmensa mayoría de los electro-enzimo-inmunoensayos, han sido contruidos sobre electrodos de carbono vitrificado y presentan el gran
15 inconveniente de la reproducibilidad, fundamentalmente debido a la gran dificultad que entraña la renovación de la superficie electródica de un electrodo de carbono vitrificado.

Hasta la fecha no se conoce ningún ensayo inmuno-electroenzimático que haya sido verificado sobre electrodos de pasta de carbono.

20 Estudios realizados recientemente por los inventores, han demostrado que recubrimientos de albúmina biotinada, estreptavidina e inmunoglobulinas pueden ser llevados a cabo sobre este tipo de electrodos con un control riguroso del recubrimiento, si se encuentran convenientemente marcadas con marcas electroquímicas o enzimáticas. Estos resultados han hecho posible que
25 se haya desarrollado un método multisensor que, apoyándose en los fundamentos de las técnicas ELISA en general y en las características adsorbtivas de la pasta de carbón convenientemente tratada, presente unas posibilidades de aplicación tan generales como las que tienen los mismos métodos ELISA, pero con unas características analíticas muy superiores. El

éxito radica en un estricto control de la superficie electródica, lo cual hace que se utilice en cada experimento una superficie con propiedades electródico-adsortivas muy semejantes.

De acuerdo con la invención, podría diseñarse un dispositivo y un método
5 tanto para cuantificar biotina como para cuantificar avidina, y como la biotina es uno de los marcadores de haptenos y macromoléculas más universal, a través de ésta podría fijarse a la pasta de carbón cualquier molécula o estructura susceptible de ser marcada con biotina.

Son, por tanto, objetivos de la invención los electroinmunoensayos analíticos
10 y electroensayos de reconocimiento biológico, que utilizan un electrodo de pasta de carbono como transductor de la señal analítica, y que tienen adsorbida sobre la superficie del electrodo una parte protéica necesaria para las interacciones bioquímicas.

Dichos electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento
15 biológico utilizan la misma superficie electródica en cada ensayo, la cual es recuperable tras un conveniente tratamiento químico-electroquímico, estando previstas pequeñas partículas de oro y partículas coloidales de oro como marca necesaria para el seguimiento de la reacción biológica, y el empleo de plata como elemento sensibilizador de la señal analítica, así como fosfatasa
20 alcalina como marca enzimática para el seguimiento de la interacción biológica.

Otro objetivo de la invención es un método de limpieza y activación de la superficie electródica que comprende:

- lavado en una disolución acuosa,
- 25 - imposición de un potencial positivo durante un tiempo adecuado,
y un método de fijación de la parte protéica sobre la superficie electródica, una vez limpia y activada, que comprende:
 - lavado en una disolución de pH adecuado,
 - adsorción controlada sobre la superficie electródica de la parte protéica.

En dicho método, está prevista la utilización de partículas de oro como marcas electroquímicas mediante:

- adsorción controlada de albúmina para eliminar adsorciones inespecíficas,
- interacción biológica entre la parte protéica absorbida sobre el electrodo y el analito que compite con el mismo analito adsorbido sobre partículas de oro o marcado con éstas,
- desarrollo de la señal analítica como consecuencia de la oxidación de las partículas de oro fijadas sobre el electrodo al someterlo a un potencial positivo en un medio de cloruros y reducirlas seguidamente en el mismo medio al efectuar un barrido voltamperométrico hacia potenciales negativos.

Preferiblemente, el método utiliza plata para sensibilizar la señal analítica mediante:

- limpieza y activación de la superficie electródica,
- recubrimiento controlado de la parte protéica sobre la citada superficie,
- eliminación de adsorciones inespecíficas con albúmina,
- fijación de partículas de oro a través de la reacción biológica sobre el electrodo,
- deposición, catalizada por las partículas de oro, de plata metálica sobre las citadas partículas al introducir el electrodo en una disolución de plata que contenga un reductor adecuado,
- oxidación de la plata metálica depositada en un medio de yoduro al someter el electrodo a un barrido de potenciales.

También preferiblemente, el método utiliza fosfatasa alcalina mediante:

- eliminación de adsorciones inespecíficas introduciendo el electrodo en una disolución de albúmina,
- interacción biológica entre la parte protéica absorbida sobre el electrodo y el analito que compite con el mismo analito marcado con fosfatasa alcalina,
- lavado para la eliminación de enzimas no fijadas por la reacción biológica,
- introducción del electrodo en el sustrato enzimático adecuado para el desarrollo de la señal voltamperométrica.

Los electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico según la invención podrían utilizar otros electrodos o ultramicroelectrodos como transductores de la señal analítica, así como emplear otros medios complejantes o precipitantes, como por ejemplo el yoduro, que se utilicen como medio sensibilizador en la oxidación de la plata.

Los electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico de la invención serían utilizables para la cuantificación de antígenos, haptenos y anticuerpos.

Un primer ejemplo de forma de realización de la invención comprende un electrodo de pasta de carbono que actúa como transductor de la señal analítica y una parte protéica adsorbida sobre la pasta que actúa como sede de las interacciones bioquímicas.

La diferencia básica en relación con un biosensor típico consiste en que después de cada experiencia será necesario limpiar la superficie electródica y renovar la capa protéica.

El transductor consiste en un electrodo de pasta de carbono, cuyo esquema básico se puede observar en los ejemplos ilustrados en las adjuntas Figuras 1 y 2.

La pasta de carbono se prepara, por ejemplo, mezclando en un mortero 5 gramos de polvo de grafito y 1,8 ml de parafina, que se sitúa en un vaciado inferior de un cilindro de teflón 1 que en su interior contiene una varilla de un metal conductor 2 que hace de contacto eléctrico entre la pasta de carbono 3 y el instrumento de medida (por ejemplo, un potencióstato) no representado.

Una vez introducida la pasta de carbono 3 en el vaciado inferior del cilindro de teflón 1, se pule la superficie exterior de ésta sobre una hoja de papel y, a continuación, se somete al siguiente pretratamiento electródico:

Se introduce el electrodo en una disolución de NH_3 1.0 M, se agita esta disolución y se le impone al electrodo un potencial de +1.00 V durante un tiempo de 120 segundos.

Este pretratamiento electródico previo a cualquier determinación o ensayo se hace totalmente imprescindible. Es el que hace que se trabaje siempre con una superficie electródica de características semejantes y que se consigan reproducibilidades superiores al 96%.

El recubrimiento de la parte protéica se describe con referencia a la Figura 1.

Una vez pretratada la superficie electródica de la pasta de carbono 3, se lava ésta en una disolución tampón de fosfato de pH 8.0 y seguidamente se introduce el electrodo en otra disolución tampón de fosfato de pH 8.0 que es a la vez 10^{-4} M en estreptavidina y se mantiene 5 minutos en esta disolución de estreptavidina, la cual se está agitando ligeramente. De esta manera se fija sobre la superficie de pasta de carbono 3 una capa de moléculas de estreptavidina 5.

A continuación, para evitar riesgos de adsorciones inespecíficas, el electrodo, una vez modificada su superficie con estreptavidina, se introduce 5 minutos en otra disolución tampón de pH 8.0 con un 1% de albúmina. De esta manera, moléculas de albúmina 4 se fijan también en la superficie electródica y bloquean los centros de adsorciones inespecíficas.

El electrodo así modificado, se convierte en un biosensor que se puede aplicar tanto a la cuantificación de biotina como a la cuantificación de avidina de una muestra desconocida.

Para el caso de cuantificaciones de biotina, el electrodo así preparado se introduciría en la muestra desconocida de biotina de un pH 8.0 durante un tiempo de incubación de 60 minutos en el cual las moléculas de biotina se unirían a una parte de las moléculas de estreptavidina adsorbidas sobre el

electrodo (siempre en exceso). Se extrae el electrodo de esta primera incubación y se introduce en otra disolución tampón de pH 8.0 que contiene albúmina biotinada adsorbida sobre partículas de oro coloidal o marcada con pequeñas partículas de oro, y se mantiene en esta disolución durante otros 60 minutos con el fin de que las moléculas de estreptavidina que habían quedado sin reaccionar con las moléculas de biotina de la muestra reaccionen ahora con las moléculas de biotina adsorbidas sobre las partículas de oro coloidal.

Finalizado este segundo período de incubación, se extrae el electrodo y se lleva a la celda de cuantificación que contiene una disolución de HCl 0.1 M además de un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl saturado. En este medio se provocan los procesos electródicos que se describirán más adelante para el oro coloidal, de tal manera que la señal registrada dependerá directamente del número de partículas de oro coloidal biotinado 6 unido a la superficie electródica a través de las interacciones estreptavidina-biotina-oro coloidal. Por lo tanto, la señal analítica estará inversamente relacionada con la concentración de biotina en la muestra.

Con esta metodología se consigue cuantificar muestras de biotina con concentraciones comprendidas entre 10^{-9} M y 10^{-6} M.

Si se quisiera cuantificar avidina con este mismo diseño, habría que hacer competir la estreptavidina adsorbida sobre el electrodo con la avidina de la muestra en disolución, por una misma concentración de albúmina biotinada adsorbida sobre oro coloidal también en disolución. A medida que hubiera menos concentración de avidina en la muestra, mayor número de partículas de oro coloidal biotinado podrían unirse a la superficie electródica modificada con estreptavidina. Por tanto, también en este caso la señal analítica estaría en relación inversa a la concentración de analito en la muestra, en este caso avidina.

Haciendo referencia al esquema de la Figura 2, la metodología sería semejante a la descrita para el esquema de la Figura 1, pero ahora el recubrimiento

- protéico que se adsorbería sobre la pasta de carbono previamente activada 3 sería albúmina biotinada 4' y albúmina 4. La concentración utilizada de albúmina biotinada sería de 10^{-4} M y, como en el esquema de la Figura 1, también se podría utilizar para cuantificar tanto biotina como avidina. Sin embargo, en este caso se utilizaría estreptavidina adsorbida sobre oro coloidal 6' para obtener la señal analítica.

Los límites de cuantificación y los rangos dinámicos lineales se asemejan a los encontrados para el esquema de la Figura 1.

- La marca electroquímica es oro coloidal. Esta marca se utiliza por primera vez como fundamento de la señal voltamperométrica para el seguimiento de esta interacción. El control de biotina o de avidina será llevado a cabo de forma indirecta a través del proceso de oxidación-reducción del oro coloidal, que consiste en lo siguiente:

- El oro coloidal adsorbido a través de la interacción queda perfectamente adherido a la superficie de pasta de carbono, ya que una agitación mecánica de la disolución de 2000 rpm es incapaz de desprender partícula alguna de oro coloidal del electrodo.

El desarrollo de la señal analítica tiene como fundamento los siguientes procesos electródicos:

- 20 1º.- $\text{Au}_{\text{coloid(ads)}} + 4\text{Cl}^- - 3\text{e}^- \text{-----} > \text{AuCl}_{4(\text{ads})}$
 2º.- $\text{AuCl}_{4(\text{ads})} + 3\text{e}^- \text{-----} > \text{Au} + 4\text{Cl}^-$

El primer proceso se provoca al someter el electrodo a un potencial de +1.25 V en relación con un electrodo de referencia de Ag/AgCl saturado con KCl, en un medio de HCl 0.1 M.

- 25 El segundo proceso es el que da lugar a la señal analítica. Una vez verificado el primer proceso, se somete el mismo electrodo a un barrido de potenciales desde +1.25 V hacia potenciales menos positivos en el que aparece un pico voltamperométrico alrededor de +0.43 V como consecuencia de

la reducción de AuCl_4 adsorbido.

De acuerdo con la invención y como otro objetivo, se ha desarrollado asimismo una sensibilización de la metodología seguida, con la finalidad de alcanzar niveles de concentración de biotina o avidina más bajos, la cual se basa en el hecho conocido y aplicado en microscopía (Dandcher, G., Worgaard, J.O.R., Histochem J., 1983, Cytochem, 31:1394-1398) de que las partículas de oro pueden aumentar de tamaño depositando sobre ellas plata metálica. Esto también se puede hacer dentro del método de la invención, con la ventaja de que cuantificar Ag sobre un electrodo sólido es mucho más fácil que cuantificar oro.

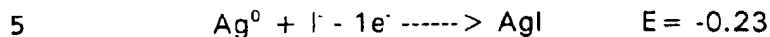
Consiste en oxidar la plata depositada en presencia de un agente complejante o precipitante de la plata.

La metodología consta de las siguientes fases:

1. Limpieza y activación de la superficie electródica. Ello supone la regeneración del electrodo al aplicar en un medio neutro potenciales positivos.
2. Recubrimiento controlado de la parte protéica sobre la superficie electródica, que consiste en adsorber sobre dicha superficie la proteína necesaria para la interacción biológica.
3. Eliminación de adsorciones inespecíficas, lo que se consigue introduciendo el electrodo en una disolución de albúmina.
4. Fijación de partículas de oro, lo que tiene lugar a través de la reacción biológica entre la parte protéica fijada en el electrodo y el analito fijado o marcado con las partículas de oro.
5. Deposición de plata metálica catalizada por las partículas de oro. Se consigue introduciendo el electrodo que tiene ya adsorbidas sobre su superficie las partículas de oro en una disolución de plata y un reductor, normalmente hidroquinina, lo cual hace que las partículas de oro se vayan rodeando de plata metálica.
6. Consecución de la señal analítica. Ésta se consigue oxidando la plata metálica depositada sobre las partículas de oro al introducir el electrodo en

una disolución de yoduro potásico y hacer un barrido voltamperométrico hacia potenciales positivos.

En presencia de I^- se obtiene un proceso de oxidación a un potencial de -0.23 V frente a un electrodo de referencia Ag/AgCl electroquímicamente reversible.



También se puede asegurar que sobre este transductor de pasta de carbono los diseños de electro-inmunosensores enzimáticos tipo sandwich funcionan con las mismas prestaciones en cuanto a reproducibilidad que los biosensores biotina/avidina.

- 10 Partiendo de un diseño convencional de electroinmunoanálisis enzimático, diseño que no es nuevo en su conjunto, y utilizando la pasta de carbono como transductor del inmunosensor, la reproducibilidad que se obtiene está por encima del 96% haciendo que este diseño tenga utilidad analítica en cuanto a sus aplicaciones.
- 15 Se han conseguido asimismo recubrimientos de inmunoglobulinas marcadas con fosfatasa alcalina como enzima y la reproducibilidad se alcanza cuando el electrodo se pretrata de la siguiente manera:
Si se utiliza por primera vez el electrodo, se somete su superficie a un potencial de +1.6 V durante 10 minutos en un tampón de fosfato de pH 9.
- 20 Este paso se hace solamente una vez. Y luego como pretratamiento que se repite para cada ensayo se hace lo siguiente:
1º) Lavado durante 2 minutos en NaOH 0.1 M con agitación.
2º) Imposición de un potencial de +1.5 V durante 5 minutos en un tampón de fosfato de pH 9.
- 25 Este pretatamiento electródico hace que la misma superficie de pasta de carbono se pueda utilizar en sucesivos ensayos con semejantes propiedades electródico-adsortivas, y estos ensayos comprenden las siguientes etapas:

- A) Recubrimiento controlado de la parte protéica sobre la superficie electródica, que consiste en adsorber sobre dicha superficie la proteína necesaria para la interacción biológica.
- B) Eliminación de adsorciones inespecíficas que se consigue introduciendo el electrodo en una disolución de albúmina.
- 5 C) Fijación de fosfatasa alcalina como consecuencia de la reacción biológica entre el recubrimiento de la parte protéica y el analito marcado con la citada enzima.
- D) Introducción del electrodo en una disolución acuosa de pH neutro con el fin de eliminar las enzimas no fijadas por la interacción biológica.
- 10 E) Introducción del electrodo en el que se ha inmovilizado la marca enzimática en sustratos tales como el naftilfosfato, que desarrollan una señal voltamperométrica adecuada al efectuar sobre el electrodo un barrido de potenciales hacia potenciales positivos.
- 15 La instrumentación básica para poner en práctica la presente invención consistiría, por ejemplo, en una celda electrolítica para tres electrodos (de trabajo, auxiliar y de referencia) y un potenciostato más un generador de ondas o un polarógrafo.
- 20 Una electroinmunotecnología de acuerdo con la invención vendría a competir con las inmunotecnologías conocidas, tales como RIA, EMIT, ELISA, etc., de las que la más representativa y más frecuentemente utilizada en la actualidad sería la ELISA, técnica frente a la cual la electroinmunotecnología de la invención presenta, entre otras, las siguientes ventajas:
- 25 - Más rápida que la técnica ELISA: desde la preparación del electrodo hasta la obtención de la señal analítica el tiempo transcurrido sería aproximadamente de 2 horas y 15 minutos. Un ELISA necesitaría desde la preparación de las placas de incubación hasta la obtención de la señal analítica tiempos siempre superiores a 24 horas.
- Más económica: el material electródico es un material relativamente muy

barato, y un mismo electrodo puede servir para más de 20 análisis aproximadamente.

- Puede llegar a ser tan sensible como los métodos ELISA, con posibilidades intrínsecas que una vez desarrolladas van a permitir una mayor sensibilidad que los citados ELISAs.
- Presenta rangos dinámicos lineales mayores; en el caso de biotina, el intervalo de concentraciones puede oscilar entre 10^{-9} M y 10^{-6} M.
- El porcentaje de dispersión de datos es siempre inferior al 4%, mientras que los porcentajes de los métodos ELISA están siempre por encima del 8%, debido fundamentalmente a que cada ensayo se hace en un pocillo diferente y al número de lavados necesarios.
- Es una tecnología fácilmente automatizable y que se puede miniaturizar con el uso de ultramicroelectrodos para la utilización de microvolúmenes.
- La instrumentación necesaria para el desarrollo de la señal analítica es una instrumentación relativamente barata (potenciostato).

REIVINDICACIONES

- 1.- Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico, que utilizan un electrodo de pasta de carbono como transductor de la señal analítica.
- 5 2.- Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico, que tienen adsorbida sobre la superficie del electrodo una parte protéica necesaria para las interacciones bioquímicas.
- 3.- Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico, según las reivindicaciones anteriores, que utilizan la misma
10 superficie electródica en cada ensayo, la cual es recuperable tras un conveniente tratamiento químico-electroquímico.
- 4.- Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico, según las reivindicaciones anteriores, que utilizan pequeñas partículas de oro y partículas coloidales de oro como marca necesaria para el
15 seguimiento de la reacción biológica.
- 5.- Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico, según las reivindicaciones anteriores, que utilizan plata como elemento sensibilizador de la señal analítica.
- 6.- Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento,
20 según las reivindicaciones anteriores, que utilizan fosfatasa alcalina como marca enzimática para el seguimiento de la interacción biológica.
- 7.- Un método de limpieza y activación de la superficie electródica que comprende:
 - lavado en una disolución acuosa,
 - 25 - imposición de un potencial positivo durante un tiempo adecuado.

- 8.- Un método de fijación de la parte proteica sobre la superficie electrodica una vez limpia y activada, según la reivindicación anterior, que comprende:
- lavado en una disolución de pH adecuado,
 - adsorción controlada sobre la superficie electrodica de la parte proteica.
- 5 9.- Un método, según la reivindicación anterior, que utiliza partículas de oro como marcas electroquímicas, según la reivindicación 4, y que comprende:
- adsorción controlada de albúmina para eliminar adsorciones inespecíficas,
 - interacción biológica entre la parte proteica absorbida sobre el electrodo y el analito que compite con el mismo analito adsorbido sobre partículas de oro
- 10 o marcado con éstas,
- desarrollo de la señal analítica como consecuencia de la oxidación de las partículas de oro fijadas sobre el electrodo, al someterlo a un potencial positivo en un medio de cloruros, y reducirlas seguidamente en el mismo medio al efectuar un barrido voltamperométrico hacia potenciales negativos.
- 15 10.- Un método que utiliza plata para sensibilizar la señal analítica, según la reivindicación 5, y que comprende:
- limpieza y activación de la superficie electrodica,
 - recubrimiento controlado de la parte proteica sobre la citada superficie,
 - eliminación de adsorciones inespecíficas con albúmina,
- 20 - fijación de partículas de oro a través de la reacción biológica sobre el electrodo,
- deposición, catalizada por las partículas de oro, de plata metálica sobre las citadas partículas al introducir el electrodo en una disolución de plata que contenga un reductor adecuado,
- 25 - oxidación de la plata metálica depositada en un medio de yoduro al someter el electrodo a un barrido de potenciales.
- 11.- Un método, según la reivindicación 8, que utiliza fosfatasa alcalina, según la reivindicación 6, y que comprende:
- eliminación de adsorciones inespecíficas introduciendo el electrodo en una
- 30 disolución de albúmina,

- interacción biológica entre la parte protéica absorbida sobre el electrodo y el analito que compite con el mismo analito marcado con fosfatasa alcalina,
 - lavado para la eliminación de enzimas no fijadas por la reacción biológica,
 - introducción del electrodo en el sustrato enzimático adecuado para el
- 5 desarrollo de la señal voltamperométrica.

12.- Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico, según las reivindicaciones 2 a 11, que utilizan otros electrodos o ultramicroelectrodos como transductores de la señal analítica.

- 10 13.- Electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico, según la reivindicación 10, empleando otros medios complejantes o precipitantes, como por ejemplo el yoduro, que se utilicen como medio sensibilizador en la oxidación de la plata.

- 15 14.- Uso de los electroinmunoensayos analíticos y electroensayos de reconocimiento biológico, según las reivindicaciones 4 a 6, para la cuantificación de antígenos, haptenos y anticuerpos.

1 / 1

Fig.1

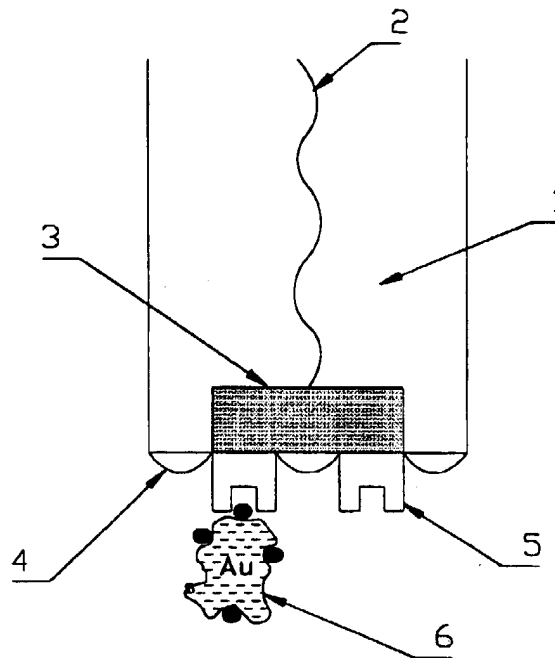
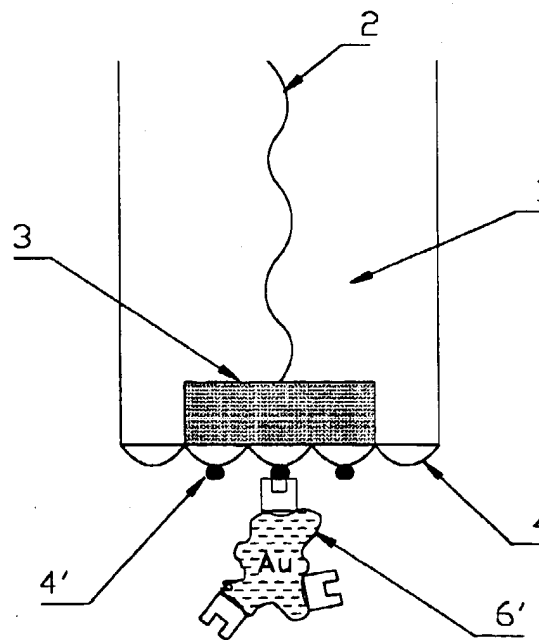


Fig.2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC., ES 96/00151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/543 C12Q1/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ELECTROANALYSIS, vol. 3, 1991, pages 319-323, XP000609698 E. LORENZO ET AL.: "Immobilized enzyme carbon paste electrodes as amperometric sensors." see the whole document ---	1-3,6,8, 11,12,14
X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 168, 1988, pages 292-299, XP000609815 S. H. JENKINS ET AL.: "Extending the detection limit of solid-phase electrochemical enzyme immunoassay to the attomole level" see the whole document ---	1-3,6,8, 11,12,14
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 November 1996		Date of mailing of the international search report 27. 11. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Cartagena y Abella,P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC./ES 96/00151

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,90 05300 (MIDWEST RESEARCH TECHNOLOGIES) 17 May 1990 see page 2, line 30 - line 34; example 3 ---	2-5,9, 10,13
X	ELECTROANALYSIS, vol. 5, June 1993, pages 421-426, XP000609699 MI-SOOK WON ET AL.: "Determination of copper(I) Ion with a chemically modified carbon paste electrode based on di(2-imino-cyclopentylidene mercaptomethyl) disulfide." see abstract ---	1,7
X	DATABASE WPI Week 9529 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-222453 XP002018788 & RU,A,1 441 991 (KAZAN AVIATION INST, UNIV KAZAN TECH) , 20 January 1995 see abstract ---	7
X	ANAL. CHEM., vol. 59, 15 July 1987, pages 1863-1867, XP000611032 JIAN-XING FENG ET AL.: "Electrochemical pretreatment of carbon fibers for in vivo electrochemistry: effects on sensitivity and response time." see the whole document ---	7
P,X	BIOELECTROCHEMISTRY AND BIOENERGETICS, vol. 38, October 1995, pages 389-395, XP000609801 M. B. GONZALEZ ET AL. : "adortive stripping voltammetric behaviour of colloidal gold and immunogold on carbon paste electrode." see the whole document -----	1-4,7-9, 12,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PL./ES 96/00151

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9005300	17-05-90	AU-A- 4647589 CA-A- 2002660	28-05-90 10-05-90

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PL./ES 96/00151

A. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN

CIP 6 G01N33/543 C12Q1/00

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 6 G01N C12Q

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	ELECTROANALYSIS, vol. 3, 1991, páginas 319-323, XP000609698 E. LORENZO ET AL.: "Immobilized enzyme carbon paste electrodes as amperometric sensors." ver el documento completo ---	1-3,6,8, 11,12,14
X	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 168, 1988, páginas 292-299, XP000609815 S. H. JENKINS ET AL.: "Extending the detection limit of solid-phase electrochemical enzyme immunoassay to the attomole level" ver el documento completo --- -/--	1-3,6,8, 11,12,14

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

21 Noviembre 1996

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

27. 11. 96

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Cartagena y Abella,P

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PC./ES 96/00151

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	WO,A,90 05300 (MIDWEST RESEARCH TECHNOLOGIES) 17 Mayo 1990 ver página 2, línea 30 - línea 34; ejemplo 3 ---	2-5,9, 10,13
X	ELECTROANALYSIS, vol. 5, Junio 1993, páginas 421-426, XP000609699 MI-SOOK WON ET AL.: "Determination of copper(I) Ion with a chemically modified carbon paste electrode based on di(2-imino-cyclopentylidene mercaptomethyl) disulfide." ver resumen ---	1,7
X	DATABASE WPI Week 9529 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 95-222453 XP002018788 & RU,A,1 441 991 (KAZAN AVIATION INST, UNIV KAZAN TECH) , 20 Enero 1995 ver resumen ---	7
X	ANAL. CHEM., vol. 59, 15 Julio 1987, páginas 1863-1867, XP000611032 JIAN-XING FENG ET AL.: "Electrochemical pretreatment of carbon fibers for in vivo electrochemistry: effects on sensitivity and response time." ver el documento completo ---	7
P,X	BIOELECTROCHEMISTRY AND BIOENERGETICS, vol. 38, Octubre 1995, páginas 389-395, XP000609801 M. B. GONZALEZ ET AL. : "adortive stripping voltammetric behaviour of colloidal gold and immunogold on carbon paste electrode." ver el documento completo -----	1-4,7-9, 12,14

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°

PC., ES 96/00151

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO-A-9005300	17-05-90	AU-A- 4647589	28-05-90
		CA-A- 2002660	10-05-90
